

中国人群 CD40L G 基因单核苷酸多态性对急性冠状动脉综合征影响的相关性研究

王新¹, 刘群²

(首都医科大学附属北京安贞医院 1. 心内科 28 病区, 2. 心内科 3 病区, 北京市 100029)

[关键词] CD40/CD40L; 单核苷酸多态性; 横断面调查; 急性冠状动脉综合征

[摘要] **目的** 新近的研究提示 CD40/CD40L 信号途径对急性冠状动脉综合征的发病及预后均具有一定影响。本研究旨在探讨 CD40L G 基因单核苷酸多态性与急性冠状动脉综合征患者冠状动脉病变程度间的关系。**方法** 搜集 2008 年 8 月至 2010 年 8 月间在北京安贞医院抢救中心确诊为急性冠状动脉综合征的患者共 482 例, 总结分析其临床特征、相关危险因素及血清单核细胞和血小板表达 CD40 水平以及 CD40L G 基因单核苷酸多态性对冠状动脉病变程度的影响。**结果** (1) 6.8% ($n=33$) 的急性冠状动脉综合征患者未检测到血清 sCD40L (<95 ng/L), 449 例患者平均血清 sCD40L 为 296 ± 25 ng/L, sCD40L 平均水平男性为 309 ng/L, 女性为 195 ng/L, 男性高于女性 ($P < 0.001$), sCD40L 水平随着冠状动脉病变程度加重而升高 ($P < 0.001$)。 (2) 不同基因型间血清 sCD40L 水平与冠状动脉评分存在显著性差异 ($P < 0.001$), 趋势具有统计学意义。其中以 GG 基因型的 sCD40L 水平最高, 为 409 ng/L, 冠状动脉病变程度最严重 ($P < 0.001$)。 (3) 多因素分析显示, 在矫正年龄、性别及高血脂、高血压、糖尿病等危险因素后, CD40L G 基因多态性与冠状动脉病变程度密切相关, 它们的 OR 值分别为 1.00、1.32、3.41 ($P \leq 0.001$)。**结论** 急性冠状动脉综合征患者血清 sCD40L 水平及 CD40L G 基因多态性与冠状动脉病变程度密切相关, 在急性冠状动脉综合征临床危险分层中, 血清 sCD40L 水平及 CD40L G 基因多态性是一个不容忽视的方面。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Soluble CD40L Levels Are Regulated by the -3459 A > G Polymorphism and Predict Acute Coronary Syndrome

WANG Xin, and LIU Qun

(Department of Cardiology, Affiliated Beijing Anzhen Hospital of Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Cluster of Differentiation 40 and Ligand; Single Nucleotide Polymorphisms; Cross-section Study; Acute Coronary Syndrome

[ABSTRACT] **Aim** Current evidence suggests the cluster of differentiation 40 and ligand (CD40/CD40L) pathway as a key process in the development, progression, and outcome of acute coronary syndrome (ACS). The aim was to investigate the prognostic importance of soluble CD40L (sCD40L) levels, single nucleotide polymorphisms (SNP) in the CD40LG gene, and the relation between sCD40L and SNPs in patients with ACS. **Methods** Samples were obtained on admission from 482 patients with ACS in Beijing Anzhen hospital. **Results** (1) In total, 6.8% ($n=33$) of the patients had undetectable (<95 ng/L) sCD40L. The average level of sCD40L in 449 patients was 296 ± 25 ng/L, the average level of sCD40L in male (309 ng/L) were higher than that in female (195 ng/L), sCD40L levels were associated with the severity of ACS ($P < 0.001$). (2) The distribution of cCD40L were different among SNP polymorphism of CD40LG, patients with GG genotype showed the highest level of sCD40L ($P < 0.001$). (3) After adjustment of age, sex, and related risk factors, polymorphism of CD40LG was related significantly with the severity of ACS, ratio odds were 1.00, 1.32, 3.41 ($P \leq 0.001$) respectively. **Conclusion** We identified a SNP in the CD40LG gene as a novel regulator of sCD40L plasma concentrations and a predictor of the severity of ACS.

[收稿日期] 2011-03-07

[作者简介] 王新, 留日医学博士, 副主任医师, 研究方向为心血管内科临床与基础, 电话为 13683347725, E-mail 为 qwangx-in45@yahoo.com.cn. 通讯作者刘群, 医学博士, 副主任医师, 研究方向为心血管内科临床与基础, 电话为 13718417822, E-mail 为 liuqunpk@sina.com.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害人类健康的常见病,其发病率有逐年增加的趋势,As 的发生机制是多因素综合作用所诱发的机体应答反应,如脂质代谢、血凝、炎症反应、细胞因子和血液动力学的影响等。众多研究表明,体液免疫和细胞免疫参与了 As 形成的全过程。而且,越来越多的证据表明,炎症反应及免疫介导在 As 的发生机制和急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 心血管突发事件发生中起重要作用。近年来的研究提示炎症和免疫与动脉粥样硬化的发生、发展有关,炎症反应的激活可能是导致斑块不稳定的主要因素。Naghavi 提出 ACS 易损患者的概念,指出了预防 ACS 及突发性心脏事件的新方向^[1],白细胞分化抗原 40 及其配体 (cluster of differentiation 40 and ligand, CD40/CD40L) 信号通路参与动脉粥样硬化斑块内主要细胞成分如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及巨噬细胞等炎症反应调节。CD40/CD40L 信号途径对 ACS 的发病及预后均具有一定影响^[2,3]。在 CD40L 信号途径中,CD154 是激活此途径的主要配体,故 CD154 又称 CD40 配体 (CD40L)。后者进一步产生一系列的炎症反应,促进黏附分子产生。然而,对 CD40L G 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 与 ACS 患者冠状动脉病变程度间关系的研究仍不深入^[4],本研究旨在观察 ACS 患者中 CD40L 水平及 CD40L G 基因 SNP 多态性,以探讨其内在关系,为 ACS 综合防治策略提供依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

搜集 2008 年 8 月至 2010 年 8 月间在安贞医院抢救中心确诊为 ACS 的患者共 482 例,其中男性 357 例 (73.2%),年龄为 27 ~ 81 岁,平均 58.5 ± 10.8 岁。女性 115 例 (24.1%),年龄为 41 ~ 84 岁,平均 63.8 ± 9.1 岁。

1.2 临床资料搜集

主要包括临床表现、体质指数 (body mass index, BMI)、高血压病史、吸烟史、糖尿病史、血脂异常、脑血管病、冠心病及周围血管病、用药史和家族史等以及体格检查和实验室检测。血压测定采用经矫正的汞柱式血压计,规定在采血前测量,测量前静坐 5 min,禁止吸烟。测坐位右上臂血压,重复测 2 次,取平均值。采集空腹静脉血,分离血清,对 sCD40L、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯

(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 等进行酶法测定。所有生化指标都由专人在日立 7600 全自动生化检测仪上进行,采用标准质控血清进行质量控制。

1.3 研究采用标准

急性冠状动脉综合征的诊断采用 2004 年《美国 ST 段抬高心肌梗死诊断及治疗指南》^[5] 的标准,2007 年《美国不稳定心绞痛及非 ST 段抬高心肌梗死诊断及治疗指南》^[6] 的标准;血脂异常的诊断采用我国 2007 年的《中国成人血脂异常防治指南》^[7] 的标准;高血压的诊断采用 2004 年《中国高血压防治指南 (实用本)》^[8];糖尿病的诊断采用我国 2007 年的《中国糖尿病防治指南》^[9];BMI 分级标准采用我国 2004 年中国肥胖问题工作组的建议^[10]。

1.4 标本的采集及处理

符合纳入标准的患者,入院后空腹 12 h 于清晨采取肘静脉血,每人采血 4 mL,抗凝管 4℃ 避光保存。实验材料: FITC 标记的鼠抗人单克隆抗体 CD40L 及溶血剂均购自美国 Pharmingen 公司,流式细胞仪购自 Becton Coulter Altra 公司。标本处理:按所检测指标 CD40L 分管,加入溶血剂 3 mL,混匀,4℃ 静置 5 ~ 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 3 mL,混匀,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入相应单抗于每管中,4℃ 避光孵育 20 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 3 mL PBS 漂洗 2 次,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加 2 mL 多聚甲醛,混匀后上机检测。

1.5 冠状动脉造影

由心内科专业医师操作,入路途径为常规经股动脉途径。左冠状动脉至少投照四个体位,右冠状动脉至少投照两个体位,必要时加其他体位至冠状动脉各段能够充分显示。结果评定标准:(1) 根据美国心脏病协会的标准,采用 Gensini 积分法^[11] 对各支冠状动脉狭窄病变定量评定,再乘以所在血管阶段系数,各阶段积分之和为病变总积分。(2) 冠状动脉狭窄直径大于、等于 50% 病变累及主要冠状动脉支数为病变支数。

1.6 CD40L G 基因 SNP 多态性位点的多态性检测

使用等位基因特异性实时聚合酶链反应 (allele specific real time polymerase chain reaction, AS RT-PCR) 方法进行。每一个样本的多态性需要两个反应体系来确定。两个体系都有其各自的 AS 引物

(AS1、AS2) 以及一个公用引物 (Common Primer, CP): AS1: 5'-aaccacgggacatgttgtag-3'; AS2: 5'-aac-cacgggacatgttggtac-3'; CP: 5'-aacttcgggaggtgcttg-3'。扩增所用 DNA 聚合酶为 Delta Z05 (Rocher, Switzerland) 高保真酶, 单个碱基的错配即可阻止该聚合酶延 3' 端的扩增。AS RT-PCR 在 GeneAmp 5700 (ABI, USA) 上进行。

1.7 统计分析方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 均数的比较用 *t* 检验, 率比较用 χ^2 检验, 多因素分析应用 Logistic 回归模型。

2 结果

2.1 一般情况

研究对象的一般情况见表 1。

表 1. 研究对象的一般情况

Table 1. Baseline characteristics of different studied groups

项 目	男性(<i>n</i> = 357)	女性(<i>n</i> = 115)
年龄	44.7 ± 11.5	46.4 ± 11.0 ^a
CD40L G 基因型(例)		
AA 型	86 (42.6%)	116 (57.4%)
AG 型	74 (49.7%)	75 (51.3%)
GG 型	46 (46.9%)	52 (53.1%)
BMI (kg/m ²)	25.1 ± 3.5	24.6 ± 3.7 ^a
腰围 (cm)	86.8 ± 9.9	80.6 ± 10.0 ^a
吸烟 (例)	220 (61.5%)	11 (9.9%) ^a
饮酒 (例)	150 (40.0%)	5 (4.3%) ^a
高血压 (例)	137 (38.5%)	38 (33.0%) ^a
血糖 (mmol/L)	5.16 ± 1.53	5.06 ± 1.78
血胰岛素	7.7 ± 6.0	8.1 ± 6.8
LDLC (mmol/L)	2.89 ± 0.81	2.89 ± 0.85
HDLc (mmol/L)	1.22 ± 0.32	1.41 ± 0.35 ^a
TC (mmol/L)	5.23 ± 1.01	5.24 ± 1.25
TG (mmol/L)	1.80 ± 1.28	1.48 ± 2.41 ^a

a 为 *P* < 0.05, 与男性比较。

表 3. 不同基因型间血清 sCD40L 水平 (ng/L, $\bar{x} \pm s$) 及冠状动脉病变评分

Table 3. Serum sCD 40L level (ng/L, $\bar{x} \pm s$) and angiographic score in different genotype

项 目	性别	AA 型	AG 型	GG 型	趋势性检验 β	<i>P</i>
Gensini 评分	男性	136.8 ± 71.8	167.5 ± 57.2 ^b	187.5 ± 72.7 ^b	0.28	0.000
	女性	116.6 ± 46.8	138.8 ± 61.9 ^a	168.2 ± 51.8 ^a	0.32	0.044
sCD40L	男性	283.6 ± 54.4	340.9 ± 43.6 ^b	416.8 ± 33.5 ^b	0.19	0.000
	女性	210.3 ± 42.7	292.7 ± 48.7 ^b	380.7 ± 54.3 ^b	0.22	0.000

a 为 *P* < 0.05, b 为 *P* < 0.01, 与 AA 型比较。

2.2 急性冠状动脉综合征患者血清 sCD40L 水平的分布特征

冠状动脉造影 Gensini 病变总积分为 8 ~ 168 分, 平均 34.5 ± 20.9 分, 以四分位法将样本分为积分逐渐增高的 4 组。病变支数为 1 ~ 3 支, 共分为 3 组。在 482 例 ACS 患者中, 血清 sCD40L 平均水平为 296 ng/L, 其中男性为 309 ng/L, 女性为 195 ng/L, 男性高于女性 (*P* < 0.001)。男女两性的 sCD40L 水平均随冠状动脉病变程度增加而升高, 其上升趋势有统计学意义 (*P* < 0.001) (表 2)。

表 2. ACS 患者中不同冠状动脉造影病变组的血清 sCD40L 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 2. Comparison of serum sCD40L level between different angiographic groups in ACS patients

项 目	男性	女性	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
病变积分				
1 组	129.96 ± 24.13	142.80 ± 62.17	0.68	0.067
2 组	345.98 ± 45.35	298.95 ± 43.14 ^b	9.06	0.000
3 组	406.28 ± 78.87	300.95 ± 42.17 ^a	13.30	0.034
4 组	423.88 ± 66.35	381.08 ± 66.18 ^a	10.21	0.042
病变支数				
1 支	210.98 ± 33.65	187.95 ± 77.23 ^a	3.73	0.036
2 支	341.05 ± 81.38	291.00 ± 36.24 ^a	3.96	0.044
3 支	411.24 ± 44.55	331.11 ± 64.44 ^b	7.28	0.000

a 为 *P* < 0.05, b 为 *P* < 0.001, 与男性比较。

2.3 不同基因型间血清 sCD40L 水平及冠状动脉病变程度

将研究对象按不同基因型进行分层, 分别比较 sCD40L 水平及冠状动脉病变程度。不同基因型间血清 sCD40L 水平与冠状动脉评分存在显著性差异 (*P* < 0.001), 趋势具有统计学意义。其中以 GG 基因型的 sCD40L 水平最高, 冠状动脉病变程度最严重 (表 3)。

2.4 基因多态性及血清 sCD40L 水平对冠状动脉病变程度的影响

为进一步阐明冠状动脉病变程度与基因多态性及血清 sCD40L 水平间的关系,将研究人群以冠状动脉病变积分分为两组:高分组与低分组;血清 sCD40L 水平以三位数为界分为两组:sCD40L < 290 ng/L 组和 sCD40L ≥ 290 ng/L 组;分析血清 sCD40L 水平及基因多态性对冠状动脉病变程度的影响。结果显示,在校正了高胆固醇、高血压、高尿酸、糖尿病和吸烟等危险因素后,血清 sCD40L 水平及基因多态性与冠状动脉病变程度显著相关(表 4)。

表 4. CD40L G 基因 SNP 多态性及血清 sCD40L 水平对冠状动脉病变程度的影响

Table 4. Impact of CD40L G SNP polymorphisms and sCD40L level on the severity of coronary lesion

项 目		病例数	调整危险因素	
			OR 值 (95% CI)	P 值
SNP 基因型	AA 型	202	1. 00	
	AG 型	149	1. 32 (0. 87, 2. 00)	0. 096
	GG 型	98	3. 41 (1. 05, 11. 05)	0. 031
sCD40L	< 290 ng/L	224	1. 00	
	≥ 290 ng/L	225	2. 50 (1. 01, 6. 17)	0. 047

危险因素包括年龄、性别、体质指数、高血脂、高血压、糖尿病和吸烟。

3 讨 论

CD40L 作为重要的炎症信号通路的配体,在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用。有研究发现 ACS 患者外周血可溶性 CD40L 水平明显升高,提示其可能与 ACS 的形成有关,并可将其作为动脉粥样硬化斑块不稳定的标志^[11],因此检测 sCD40L 水平对 ACS 患者的病情判断或预后估计有着一定的临床意义。

本研究以 ACS 患者为研究对象探讨 ACS 人群中 sCD40L 分布水平及其影响因素。结果显示,在经冠状动脉造影诊断为 ACS 的 482 名患者中,血清 sCD40L 平均水平为 296 ng/L,其中男性为 309 ng/L,女性为 195 ng/L,男性高于女性,与国内外相关研究结果相似^[12,13]。

既往研究提示血脂、血压、血糖和吸烟是影响 sCD40L 水平的重要因素^[14]。本研究在考察高血清 sCD40L 水平及其基因多态性对冠状动脉病变程度的影响时对相关的危险因素进行了校正,较准确地评估了其冠状动脉病变程度的相关性。研究发现

斑块破裂与斑块内炎症反应有关,近年有文献^[1]报道 CD40/CD40L 广泛存在于粥样斑块的各种细胞(内皮细胞、平滑肌细胞、单核/巨噬细胞),其相互作用显著影响相关细胞的功能,并且与斑块的稳定性密切相关。阻断这一系统的相互作用可以防止动脉粥样斑块的发生与发展。

大量基础与临床的研究资料显示,免疫与炎症反应在 ACS 的发生、发展过程中起着重要的作用,炎症反应的激活是导致斑块不稳定的主要因素^[15]。ACS 患者 sCD40L 是增加的,这种升高程度在 ACS 患者中与其因心血管疾病死亡的时间和生活质量密切相关^[8],而在正常人则可作为冠心病发病的独立的危险因素^[14]。这主要是由于血小板被激活后在膜 CD40L 增多的同时,大量释放 sCD40L,刺激氧化低密度脂蛋白使血管平滑肌细胞变性,介导局部炎症反应,加速粥样斑块形成。CD40/CD40L (CD40 配体)是一对互补跨膜糖蛋白,作为免疫及炎症反应中重要的信号转导系统,在动脉粥样硬化及 ACS 的发病机制中起着极为关键的作用,它几乎贯穿动脉粥样硬化发生发展乃至斑块破裂继发血栓形成的全过程。淋巴细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞及激活的血小板均可表达 CD40L,但只有游离于血液循环中的可溶 CD40L 才具有生物活性,研究证实血液循环中 95% 以上的 sCD40L 来源于激活的血小板^[16,17]。血栓形成是 ACS 的早期病理过程,血栓的重要成分为血小板,而血小板在激活后可大量表达释放 sCD40L 入血,因此测定血清 sCD40L 水平可早期反映 ACS 的病理生理过程。早期应用药物降低 ACS 病人血清 sCD40L 水平,对于延缓或阻断动脉粥样硬化的发生发展,使粥样斑块稳定具有非常重要的临床价值。

急性冠状动脉综合征患者血清 sCD40L 水平明显升高,提示 CD40L 可作为动脉粥样硬化斑块不稳定的一个重要标志,参与 ACS 的发生。国外研究显示 -3459 A > G SNP 多态性与血清 sCD40L 水平密切相关^[18],本研究中 G 等位基因型显著增高血清 sCD40L 水平,G 等位基因携带者冠状动脉病变程度也较严重。

血清 sCD40L 水平被认为是一个冠状动脉病变程度的有效生物标记物,CD40G 基因 -3459 A > G SNP 多态性与冠状动脉病变程度的密切相关为临床实践中从基因水平对患者进行高危程度分层,从而探讨更科学有效的治疗方案提供理论基础。

本研究的局限性:本研究是横断面资料,不能反映出血清 sCD40L 水平与其它 ACS 危险因素时间上

的变化情况,无法分析其对心脏病程的影响。

[参考文献]

- [1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I[J]. *Circulation*, 2003, 108(14): 1 664-672.
- [2] Stein JH, Johnson HM. Carotid intima-media thickness, plaques, and cardiovascular disease risk: implications for preventive cardiology guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(15): 1 608-610.
- [3] 张峻,陈纪林,顾晴,等. CD40-CD40 配体系统对动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(2): 119-122.
- [4] 刘胜林,郭志刚,刘凌,等. 124 例冠心病患者三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 基因启动子区-477C/T 单核苷酸多态性分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(4): 475-478.
- [5] Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines[J]. *Circulation*, 2004, 110(9): e82-e292.
- [6] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non - ST-elevation myocardial infarction: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(7): e1-e157.
- [7] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(5): 390-419.
- [8] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南[J]. *中华高血压杂志*, 2004, 12(13): 6-9.
- [9] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2007 年版)[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(18): 1 227-245.
- [10] 王薇,赵冬,刘静,等. 中国 35~64 岁人群胆固醇水平与 10 年心血管病发病危险的前瞻性研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(12): 169-173.
- [11] Varo N, De Lemos JA, Libby P, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2003, 108(9): 1 049-052.
- [12] Lutgens E, Cleufiens KB, Heenman S, et al. Both early and delayed anti-CD40 L antibody treatment induces a stable plaque phenotype[J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7 464-469.
- [13] Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, et al. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the vesnarinone trial (VEST)[J]. *Circulation*, 2001, 103(16): 2 055-059.
- [14] Hanan H. Fouad, Husain Al-Dera, Sameh W. Bakhoun, et al. Levels of sCD40 ligand in chronic and acute coronary syndromes and its relation to angiographic extent of coronary arterial narrowing[J]. *Angiology*, 2010, 61(6): 567-573.
- [15] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [16] Lutgens E, Cleufiens KB, Heenman S, et al. Both early and delayed anti-CD40 L antibody treatment induces a stable plaque phenotype[J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7 464-469.
- [17] Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of mono/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor[J]. *Circulation*, 1997, 96(18): 396-399.
- [18] Mälarstig A, Lindahl B, Wallentin L, et al. Soluble CD40L levels are regulated by the - 3459 A > G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7): 1 667-673.

(此文编辑 曾学清)